Lane Medical Library

Über den Einfluß von Krankheiten auf die Serumeiweißkörper.

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

einer Hohen Medizinischen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität

zu München

vorgelegt von

Erwin Schörner

aus Schwarzenbach-Saale.

im Juni 1935.

Kallmünz

Buchdruckerei von Michael Laßleben

1935.

Referent: Prof. Dr. Schittenhelm.

Meinen lieben Eltern.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40153312_0273

Diese Arbeit wurde vom 15. Oktober 1934 bis 30. November 1934 im chemischen Laboratorium der II. Medizinischen Universitäts-Klinik in München und vom 1. Dezember 1934 bis 8. Juni 1935 am Institut für vegetative Physiologie der Universität Frankfurt a. M. auf Anregung und unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Kurt Felix ausgeführt.

Auch an dieser Stelle möchte ich meinem hochverehrten Lehrer für die Überlassung dieser Arbeit sowie für die außerordentlich vielfachen Anregungen und für die liebenswürdige Unterstützung bei ihrer Ausführung meinen aufrichtigsten Dank aussprechen.

In seinen Arbeiten über den Aufbau der Eiweißkörper hat Sörensen zum ersten Mal durch zahlreiche Untersuchungen festgestellt, daß sich im Serum nicht nur ein einziger Eiweißkörper befindet, sondern daß sich durch besondere Fällungsmethoden mit verschiedenen Neutralsalzen bei verschiedenen Konzentrationen mehrere Eiweißfraktionen gewinnen lassen. Auf diese Weise hat er z. B. das Euglobulin und Pseudoglobulin und noch mehrere andere Eiweißfraktionen aus dem Serum isolieren können. Er nahm an, daß es sich bei diesen verschiedenen Fraktionen des Eiweißes um verschiedene Körper handelt, die sich in ihrem molekularen Bau von einander unterscheiden, vor allem hinsichtlich der Größe ihrer Moleküle.

Nach den Untersuchungen Svedberg's[1] sind Albumine und Globuline hinsichtlich des Dispersitätsgrades, wie er mit Hilfe der Ultra-Zentrifuge feststellen konnte, einheitliche Körper und Euglobulin und Pseudoglobulin Kunstprodukte, die bei der fraktionierten Fällung aus dem einheitlich aufgebauten Albumin und Globulin entstehen. Daraus folgt, daß Euglobulin und Pseudoglobulin zu ursprünglich größeren, leicht zerlegbaren Komplexen im Serum miteinander verbunden sein müssen. Dabei können kleinere Bausteine des Moleküls, wie die Aminosäuren, innerhalb bestimmter Grenzen wechseln.

Nach der Ansicht von Sörensen[2] haben wir uns den Aufbau des Eiweißmoleküls aus einer Anzahl locker und reversibel aneinander gebundenen Komponenten vorzustellen. Er spricht vom Eiweißmolekül als einem reversibel dissoziablen Komponentensystem. Die Kräfte zwischen den Komponenten sind verhältnismäßig schwache Restvalenzen, die durch die physikalische und chemische Struktur der Komponenten bestimmt sind. Sie werden durch die Kräfte in der Lösung beeinflußt. Die Dissoziationsfähigkeit ermöglicht eine reversible Fraktionierung der Komponenten unter geeigneten Bedingungen. Je nach der Stärke der Restvalenzen ist die Dissoziationsfähigkeit der verschiedenen Proteine verschieden groß und die Aufspaltung der Komponentensysteme davon abhängig. Im Serum-Albumin und- Globulin nimmt er ein Gemisch von Komponentensystemen an, die leicht aufgespalten werden können. In diesen Gemischen äußern sich die Assoziationskräfte auch zwischen den verschiedenen Systemen, sodaß es zur Bildung neuer Systeme kommt. Es kann deshalb aus den Eigenschaften der Serumfraktionen auf das ursprüngliche System nicht geschlossen werden. Die aus den Komponentensystemen gewonnenen Fraktionen weisen aber solche Ähnlichkeit mit der Muttersubstanz auf, daß die Beibehaltung des Namens der Muttersubstanz auch für die Fraktionen berechtigt ist.

Diese Theorien von Sörensen und Svedberg über den Bau des Eiweißmoleküls haben eine Gruppe anderer Forscher dazu

veranlaßt, den Aufbau des Eiweißmoleküls, vor allem in den verschiedenen Fraktionen des Serums, von einer anderen Seite aus zu klären, und zwar von den einzelnen Bausteinen des Moleküls, den Aminosäuren. Sie bestimmten den Gehalt an Aminosäuren in den einzelnen Eiweißfraktionen und ihr Verhältnis zueinander. Die Methoden waren dabei verschieden. Die einen verwendeten spezifische Farbenreaktionen bestimmter Aminosäuren und ihre kolorimetrische Bestimmung, andere trennten bestimmte Aminosäuren auf Grund der verschiedenen Löslichkeit ihrer Silbersalze.

So stellten Anton Fischer und Alfred Blankenstein[3] sieben verschiedene Eiweißfraktionen durch Fällung mit verschiedenen Konzentrationen neutraler Salzlösungen her und untersuchten sie auf ihren Gehalt an bestimmten Aminosäuren. Die Werte waren bei den einzelnen Fraktionen verschieden und sie schlossen daraus auf eine Verschiedenheit der Struktur dieser Eiweißkörper, d. h. Albumin und Globulin sind selbst als ein Gemenge aus mehreren konstitutionell verschiedenen Eiweißkörpern aufzufassen. Sie gehen in ihren Schlußfolgerungen sogar noch weiter und erklären, daß es vielleicht möglich sein werde, mit feineren Methoden der Eiweißanalyse noch viel mehr voneinander verschiedene Eiweißfraktionen feststellen und isolieren zu können.

Wohl durch die Untersuchungsergebnisse Svedberg's über den einheitlichen Aufbau des Moleküls angeregt, untersuchte Block[4] die Hydrolysate verschiedener Keratine und Protamine auf ihren Gehalt an Aminosäuren. Dabei fand er immer ein konstantes Mengenverhältnis von Histidin zu Lysin und Arginin (1:4:12). Auf Grund dieser Feststellung vermutete er, daß auch das molekulare Verhältnis der Hexonbasen im Gesamteiweiß der verschiedenen Seren, trotz wechselnden Albumin- und Globulin-Gehaltes, konstant sei. Er fällte Histidin, Arginin und Lysin als Diflavianat, Flavianat und Pikrat und stellte das molekulare Verhältnis fest. Dabei kam er zu dem überraschenden Ergebnis, daß das Verhältnis von Arginin zu Lysin immer konstant bleibt, nämlich 10:17 oder 10:18, auch wenn das Verhältnis von Albumin zu Globulin sich um das 10fache ändert. Daraus schließt er, daß es im Serum des Menschen und der Tiere überhaupt nur einen einzigen Eiweißkörper gibt, und daß die verschiedensten Fraktionen, die man aus dem Eiweiß durch verschiedene Fällungsmethoden gewinnen kann, nur Kunstprodukte sein können, die durch Einwirkung chemischer Reagenzien bei ihrer Isolierung entstanden sind. Er lehnt die bisherige Anschauung, daß es im Serum zwei Eiweißkörper oder besser Körpergruppen gibt, nämlich die Albumine und Globuline, ab.

In der folgenden Arbeit soll diese Vermutung nachgeprüft werden. Es wurden dazu sieben verschiedene Seren mit normaler und erhöhter Senkungsgeschwindigkeit, also mit verschiedenem Albumin- und Globulingehalt, auf ihren Gehalt an Aminosäuren untersucht, sowohl im Gesamteiweiß wie in den Albumin- und Globulin-Fraktionen.

Zur Bestimmung der Aminosäuren verwendeten wir ihre Eigen-

schaft, bestimmte Farbenreaktionen zu geben, die sich für kolorimetrische quantitative Bestimmungen auswerten lassen. Diese Methode ist in den letzten Jahren durch Anwendung des Stufenphotometers sehr vervollkommnet worden.

Experimenteller Teil.

Die Darstellung des Gesamteiweißes aus dem Serum, das durch Zentrifugieren von Schüttelblut gewonnen wurde, erfolgte mit der Aceton-Methode von Piettre und Vila, wie sie von Arcand[5] beschrieben wurde. Die Ausführung ist folgende: 100 ccm Serum werden in einem Becherglas von 600 ccm in Eis gekühlt und tropfenweise rasch unter Rühren 250 ccm ($2^1/_2$ faches Volumen) auf 0^0 abgekühltes Aceton zugegeben. Die Proteine fallen in kleinen Flocken aus und werden rasch zur Trockne abgesaugt. Dann wird 2 mal mit je 100—120 ccm Aceton nachgewaschen, und weiterhin zur Entfernung des Acetons 3—4 mal mit trockenem Äther. Um noch letzte Reste von Aceton, das Eiweißkörpern gewöhnlich sehr fest anhaftet, zu entfernen, wird 5—6 mal mit trockenem Äther verrieben und abgesaugt. Man braucht etwa 500 ccm Äther. Das Eiweiß wird nun noch im Trockenschrank bei 110^0 oder im Vacuum-Exsikator über P_2O_5 getrocknet.

Die Globuline werden nach der von Paul Howe[6] angegebenen Methode mit einer 22,2%igen Natriumsulfat-Lösung ausgefällt. Da diese Na_2SO_4-Lösung eine fast gesättigte Lösung ist, wird sie vor der Fällung im Brutschrank aufbewahrt. Vor dem Gebrauch wird die Lösung vorsichtig, um Auskristallisieren zu vermeiden, auf Zimmertemperatur abgekühlt. Bei der Ausfällung der Globuline werden 100 ccm Serum in 3 Liter dieser Natriumsulfat-Lösung gebracht (die Endkonzentration der Natriumsulfat-Lösung beträgt 21,5%). Zur Absetzung der ausgefällten Globuline läßt man 1—2 Tage im Brutschrank stehen, wobei sich die Globuline flockig absetzen (zur Sterilhaltung einige Tropfen Toluol zugeben). Die überstehende klare Flüssigkeit hebert man nun vorsichtig ab und die verbleibende Suspension gibt man durch ein Filter. Der Rückstand wird dann mit heißem Wasser vom Filter gespült und das gesamte Globulin in Wasser wieder aufgelöst. In der abgeheberten Flüssigkeit und im Filtrat, das die Albumine enthält, werden diese durch Kochen zur Koagulation gebracht. Ebenso gewinnt man auch das Globulin aus der Lösung. Das koagulierte Eiweiß wird dann abgesaugt und mit heißem Wasser ausgewaschen, dann wäscht man mit Aceton und Äther nach wie beim Gesamteiweiß. Man erhält so ein feines weißes Pulver.

Hydrolyse und Bestimmung der Aminosäuren.

Die Hydrolyse der verschiedenen Eiweißkörper zur Bestimmung einzelner Aminosäuren wird verschieden durchgeführt, da sich die einzelnen Aminosäuren, wie durch eingehende Untersuchungen festgestellt worden ist, bei der Hydrolyse sehr verschieden verhalten.

Aus dem Eiweiß-Molekül werden einzelne Aminosäuren, besonders Tryptophan und auch das Tyrosin sehr leicht abgespalten und bei längerer Einwirkung von Säuren vielleicht auch zerstört.

Zur Bestimmung der einzelnen Aminosäuren wurden folgende Methoden angewendet:

1). Tryptophan.

Zum Nachweis des Tryptophans wurde die Reaktion von Adamkiewicz-Hopkins angestellt, die auf der Farbenreaktion des Tryptophans mit Glyoxylsäure und konzentrierter Schwefelsäure beruht. Winkler[7] hat dieses Verfahren für das Stufenphotometer ausgearbeitet. Die Intensität der blauvioletten Farbe ist, wie von Winkler gezeigt wurde, abhängig von einem geringen Kupferzusatz.

Lösungen: 1). m/2000 Tryptophan-Lösung,

2). Glyoxylsäure-Lösung, deren Darstellung nach Benedikt erfolgt: Man bedeckt 10 g pulverisiertes Magnesium in einem großen Erlenmeyer-Kolben völlig mit H_2O, schüttelt, fügt 250 ccm einer gesättigten wässrigen Oxalsäure-Lösung langsam hinzu, wobei unter der Wasserleitung gekühlt wird, schüttelt, filtriert, wäscht mit wenig Wasser, säuert mit Essigsäure an und füllt mit H_2O auf 1 Liter auf.

3). m/100 Kupfersulfat-Lösung.

4). Konzentrierte Schwefelsäure.

Die Ausführung ist folgende: Zunächst stellt man sich mit der m/2000 Tryptophan-Lösung eine Eichkurve her, indem man 0,2 bis 1,5 ccm dieser Lösung mit 0,50 ccm eines Gemisches von 0,20 ccm Glyoxylsäure-Lösung und 0,30 ccm m/100 Kupfersulfat-Lösung mischt, dann füllt man auf 3,0 ccm mit Wasser auf. Der eiskalten Lösung wird 5 ccm konzentrierte Schwefelsäure, die gut vorgekühlt ist (—5 bis —10°), langsam zugesetzt. Die Lösung wird bei Zimmer-Temperatur oder über Nacht 3—4 Stunden stehen gelassen und erhitzt sie dann gleichzeitig in einem kochenden Wasserbade 5 Minuten lang. Die Ablesung am Stufenphotometer erfolgt mit Farbfilter S. 530 bei einer Schichtdicke von 10 mm. Die erhaltenen Werte werden auf einem halblogarithmierten Papier eingetragen, wo die Verbindung der einzelnen Punkte eine Gerade ergibt.

Für die Untersuchung des Eiweißes löst man 100 mg Eiweiß in 4 ccm 30%iger Kalilauge im Wasserbade und füllt auf 10 ccm mit Wasser auf. Davon nimmt man 0,5 oder 1,0 ccm und stellt dieselbe Farbenreaktion wie bei der reinen Tryptophan-Lösung an. Die auf dem Photometer abgelesenen Werte werden in die Eichkurve eingetragen und daraus der Prozentgehalt des Eiweißes an Tryptophan berechnet. Die Zahlen werden am Schlusse in einer Tabelle zusammengefaßt.

Zum Vergleich wurde in einzelnen Fällen auch die Voisnet'sche Reaktion angestellt, die auf der Violettfärbung von Tryp-

tophan mit Formaldehyd in Gegenwart schwach nitrithaltiger Salzsäure beruht. Diese Werte waren aber unsicher.

2). Tyrosin.

Zum Nachweis des Tyrosins wurde die bekannte Millon'sche Reaktion verwendet, wie sie von Otto Fürth und Anton Fischer[9] in ihren Bedingungen geprüft und ausgearbeitet wurde.

Lösungen:
1). 20%ige Phosphorwolframsäure.
2). 5%ige Chininsulfatlösung in 5%iger Schwefelsäure.
3). 30%ige Natronlauge.
4). 50%ige Schwefelsäure.
5). 0,1% ige Tyrosin-Standardlösung in 5% iger Schwefelsäure.

Ausführung: 1 g trockenes Eiweiß läßt man in 2 ccm konzentrierter H_2SO_4 und 12 ccm H_2O in einem Hartglaskölbchen mit aufgesetztem Rückflußkühler 12 Stunden langsam sieden. Dann wird auf 40 ccm aufgefüllt. 20 ccm von diesem Hydrolysat werden mit 30 ccm 20% iger Phosphorwolframssäure gemischt und einen Tag stehen gelassen. Dann saugt man durch ein trockenes nicht zu großes Filter ab und versetzt das Filtrat mit 5%iger Chininsulfatlösung. Man saugt wiederum ab und gibt einige ccm einer 30%igen Natronlauge hinzu, bis das überschüssige Chininsulfat wieder ausgefallen ist. Dann filtriert man ab und säuert mit einigen ccm einer 50%igen Schwefelsäure an. Man muß die verschiedenen Fällungen stets in Meßcylindern vornehmen, um die jeweilige Eiweißkonzentration sofort berechnen zu können. Für die Ablesung am Kolorimeter eignet sich am besten eine 0,3 bis 0,6%ige Eiweißlösung. Der Farbenvergleich geschieht im Dubosq-Kolorimeter mit verschiedenen Verdünnungsreihen gegen die Tyrosin-Standard-Lösung, die ebenfalls auf das 1—10fache verdünnt wird. Stärkere Eiweißkonzentrationen sind zu vermeiden, da bald Trübungen auftreten. Zu 10 ccm der Lösungen gibt man 2 ccm des Millon-Reagenzes und liest nach ungefähr $^3/_4$ Stunden am Kolorimeter ab, da dann die Farbenintensität am größten ist. Sie ist außerdem abhängig vom pH.

3. Cystin.

Für die Bestimmung des Cystins eignet sich die von Sullivan[9] angegebene Naphthochinon-Reaktion sehr gut. Sie beruht darauf, daß das Cystin nach Reduktion mit Natriumcyanid mit 1,2-naphthochinonsulfosaurem Natrium und Alkali eine Rotfärbung gibt, die durch reduzierende Substanzen, wie Natriumhyposulfit, nicht verändert wird. Die Reaktion ist nach den Untersuchungen von Sullivan streng spezifisch für Cystin.

Lösungen: 1. 5%ige Natriumcyanid-Lösung,
2. 0,5%ige Lösung von 1,2-naphthochinon-4-Natriumsulfonat (jederzeit frisch zu bereiten).

3. 10%ige Natriumsulfit-Lösung in 0,5 n/Natronlauge (täglich frisch herstellen).
4. 25%ige Natronlauge.
5. 2%ige Natriumhyposulfit-Lösung in 0,5 n/Natronlauge (täglich frisch herstellen).
6. 0,1%ige Cystin-Standard-Lösung in 0,1-n/Salzsäure.

Ausführung: 1 g trockenes Eiweiß wird mit dem 10—20 fachen Volumen 20%iger Salzsäure 6 Stunden lang hydrolysiert, mit Kohle entfärbt, dann verdünnt, auf pH 2—3 gebracht und mit 0,1-n/HCl auf ein bestimmtes Volumen gebracht. Zu 5 ccm der Lösung werden 2 ccm der Lösung 2 hinzugegeben, nach 10 Minuten 1 ccm von Lösung 3, gemischt, dann 5 ccm der Lösung 4. Darauf läßt man 25 Minuten bei 35° stehen und gibt dann 2 ccm der Lösung 5 und 1 ccm der Lösung 6 hinzu. Die Lösung wird kolorimetrisch mit einer ebenso behandelten Cystin-Standard-Lösung verglichen. Dabei werden am besten ebenfalls verschiedene Verdünnungsgrade hergestellt und mit der entsprechenden Farbenintensität der zu untersuchenden Lösung verglichen. Die Konzentration der Lösung beträgt am besten 0,5% bezüglich ihres Eiweißgehaltes.

Eine für das Stufenphotometer ausgearbeitete Methode, die von Lugg modifiziert wurde, schaltet den Einfluß des Luftsauerstoffes bei der Reaktion durch Einleiten von Stickstoff aus. Für vergleichende Cystin-Werte halte ich aber die Werte von Sullivan für zuverlässig genug.

4. Arginin.

Der Nachweis von Arginin beruht auf der von Sakaguchi angegebenen Farbenreaktion mit α-Naphthol und Hypobromit-Lösung. Es ist eine sehr empfindliche Reaktion, die selbst den Nachweis von kleinsten Mengen von Arginin gestattet, aber sie ist nicht spezifisch, denn die Farbe tritt auch bei Anwesenheit von Guanidinen auf. Zu diesem Zweck wird das Arginin — genau wie bei Histidin und den anderen Aminobasen — aus dem Eiweiß-Hydrolysat gefällt. Dazu gibt es zwei Methoden, das Kossel-Patten-Verfahren und die Ausfällung mit Phosphorwolframsäure nach Van Slike.[10] Wir wählten die letztere Methode: 1—2 g Eiweiß werden in 10—20 Teilen 20%iger HCl 16 Stunden lang hydrolysiert, dann mit Kohle entfärbt und gut ausgewaschen. Nachdem neutralisiert und auf ein bestimmtes Volumen (100 ccm) aufgefüllt worden ist, wird auf 1 g Eiweiß 6 ccm konzentrierte HCl und eine 5 g Phosphorwolframsäure enthaltende Lösung zugegeben. Die Lösung wird mit Wasser verdünnt und in einem Wasserbad erhitzt, bis die Basenfällung nahezu und vollständig wieder aufgelöst ist. Man läßt 48 Stunden lang stehen und saugt dann ab. Das Auswaschen des Niederschlages von den anhaftenden Monoaminosäuren erfolgt mit möglichst geringen Mengen einer Waschlösung, die 2,5% Phosphorwolframsäure und 3,5% konzentrierte HCl enthält. Der Niederschlag wird möglichst trocken gesaugt und dann 8—10 mal unter Aufrühren nachgewaschen. Die Fällung und das Waschen der Hexon-

basen muß bei 0° ausgeführt werden. Der so erhaltene Niederschlag wird mitsamt dem Filter in 3 n/Natronlauge gelöst und dann mit 10%iger Essigsäure wieder neutralisiert oder schwach sauer gemacht. Zur Bestimmung des Arginins wird die Lösung verdünnt, für 1 g Eiweiß auf 4 Liter. Durch Herstellung verschiedener Verdünnungsreihen hat sich nämlich gezeigt, daß die Farbenintensität nicht proportional der Verdünnung ist, sondern bis zu einem gewissen Punkt mit zunehmender Verdünnung stärker wird, um dann wieder abzufallen. Über die Ursache dieses Verhaltens konnte ich keinen Anhaltspunkt gewinnen, es wäre aber geeignet, in einer besonderen Arbeit aufgeklärt zu werden. Man kann also die Kolorimetrie nur von einem ganz bestimmten Verdünnungsgrade an gebrauchen. Am besten hat sich die Verdünnung von 1 : 4000 erwiesen, da man dabei die höchste Farbenintensität inbezug auf den Argiringehalt erhält. Die Farbenreaktion selbst wird nach der von Weber für das Stufenphotometer umgearbeiteten und von Erik Jorpes und S. Thoren[11] modifizierten Methode ausgeführt:

Lösungen: 1. Arginin-Lösung, die 0,04 bis 0,07 mg Arginin in 5 ccm enthält.
2. 10%ige Natronlauge.
3. 0,02%ige Lösung von α-Naphthol, die jederzeit frisch durch Verdünnung von 20 ccm einer Stammlösung (0,1%igen Alkohol) auf 100 ccm Wasser hergestellt wird.
4. Hypobromit-Lösung durch Lösen von 2,5 g (0,46 ccm) Brom in 100 ccm 5%iger kalter Natronlauge. Die Lösung hält sich in der Kälte monatelang.
5. 40%ige Harnstofflösung.

Ausführung: 5 ccm der Arginin-Lösung werden in Eis gekühlt. 1 ccm der Lösung 2 und 1 ccm der Lösung 3 werden hinzugefügt, gemischt und gut in Eis eingebettet. Nach 1 Stunde werden 0,2 ccm der Lösung 4 unter heftigem Schütteln hinzugesetzt und genau 15 Sekunden später 1 ccm der Lösung 5. Die photometrische Ablesung wird gegen Wasser mit Filter S. 50 innerhalb 6—8 Minuten gemacht. Die Schichtdicke beträgt 5 mm. Der Argiringehalt wird direkt aus einer auf halblogarithmiertem Papier aufgezeichneten Eichkurve abgelesen. Die Eichkurve wird nach der schon oben beschriebenen Methode hergestellt, und zwar mit einer Lösung von Argininmonochlorhydrat, das aus Gelatine nach dem Verfahren von Felix und Dirr rein kristallinisch dargestellt wurde.

5. Histidin.

Histidin kann man durch die Farbenreaktion nach Pauly mit Diazobenzolsulfosäure nachweisen. Da auch Monoaminosäuren, wie das Tyrosin, mit Diazobenzolsulfosäure eine Farbenreaktion geben, so muß auch hier das Histidin wie bei Arginin isoliert werden, welches nach der gleichen Methode von Van Slike ausgeführt wurde. Zum quantitativen Nachweis wird die von Erik

Jorpes[12] für das Stufenphotometer ausgearbeitete und geprüfte Methode gewählt. Die zu untersuchende Lösung wird dabei aber nur auf 1 : 2000 verdünnt, weil man hier die günstigsten Werte für die Ablesung am Stufenphotometer erhält. Die Werte wurden dann aus einer mit Histidin-Dihydrochloridlösung aufgestellten Eichkurve entnommen.

Lösungen: 1. Eine neutrale oder schwach saure Histidinlösung, die 0,05—0,005 mg Histidin pro ccm enthält.

2. Eine Diazolösung, die nach der Beschreibung von Kößler und Hanke hergestellt wurde: Zu 1,5 ccm einer Lösung, die 0,9 g Sulfanilsäure und 9 ccm konzentrierte HCl in 100 ccm enthält, werden 1,5 ccm einer 5%igen Natriumnitritlösung hinzugefügt. Die Lösung wird 5 Minuten in Eis gekühlt und dann 6 ccm der Nitritlösung unter Schütteln hinzugefügt und nach weiteren 6 Minuten mit Wasser auf 50 ccm aufgefüllt. Die Diazolösung soll auf Eis aufbewahrt werden. Sie hält sich 24 Stunden lang. Die Lösung von Sulfanilsäure hält jahrelang. Die besten Resultate werden erhalten, wenn die 5%ige Natriumnitritlösung frisch bereitet wird.

3. 1,1%ige Natriumkarbonatlösung (Kahlbaums wasserfreie Soda).

Ausführung: Zu 1 ccm der Lösung 1) gibt man 2 ccm der Lösung 2), nach 1—3 Stunden 5 ccm der Lösung 3). Die photometrische Ablesung wird mit Filter S. 50 4—8 Minuten nach der Hinzufügung der Lösung 3) gemacht.

Beispiel für die Untersuchung eines Serums auf verschiedene Aminosäuren.

Serum 1.

Serum mit normaler Senkungsgeschwindigkeit (BSG 5 im Mittelwert) eines Patienten mit Hypertonie.

Die Eiweißkörper (Gesamteiweiß, Albumin und Globulin) werden nach den oben angeführten Methoden ausgefällt. Die Gewichtsprozente waren folgende:
Gesamteiweiß: 8,9%; Albumin: 4,7%; Globulin: 2,69%.
Verhältnis Albumin: Globulin 1,75 : 1.

1. Bestimmung des Tryptophans.

100 mg der getrockneten Eiweißkörper werden mit 4 ccm einer 30%igen Kalilauge auf dem Wasserbade gelöst und dann auf 10,0 mit H_2O aufgefüllt. Man nimmt 0,5 ccm von der Lösung und stellt die oben beschriebene Farbenreaktion nach Adamkiewicz an. Die abgelesenen Werte am Stufenphotometer waren folgende:

Gesamteiweiß:	54; 52; 54,5, 55.
Albumin:	64; 64; 63,5.
Globulin:	30; 33; 33.

Die aus der Eichkurve entnommenen Werte für Tryptophan waren folgende:

Gesamteiweiß:	0,088 mg	Tryptophan	pro 1 ccm
Albumin:	0,062 „	„	„
Globulin:	0,166 „	„	„

Da wir 0,5 ccm einer 0,1%igen Eiweißlösung gebraucht haben, berechnet sich der Prozentgehalt an Tryptophan, indem man den gefundenen Wert einfach mit 20 multipliziert. Es ergeben sich so für:

Gesamteiweiß:	1,76% Tryptophan,
Albumin:	1,24% „ „
Globulin:	3,32% „ „

2. Tyrosin.

1 g trockenes Eiweiß wird im Hartglaskölbchen am Rückflußkühler hydrolysiert und dann das Hydrolysat auf 20,0 aufgefüllt. Es ist dann eine 5%ige Eiweißlösung. Dazu gibt man 30 ccm einer 20%igen Phosphorwolframsäure-Lösung (Eiweißkonzentration 2%). 36 ccm des Filtrates versetzt man mit 12 ccm Chininsulfat (Konzentration 1,5%) und zu 33 ccm dieses Filtrates wiederum setzt man 9 ccm 30%ige Natronlauge hinzu (Konzentration 1,18%), und säuert dann mit 3 ccm 50%iger H_2SO_4 an (Konzentration 1,07%). Um eine Endkonzentration von 0,6 bis 0,3% zu erhalten, verdünnt man weiter mit 5%iger Schwefelsäure. Von dieser Lösung versetzt man 10 ccm mit 2 ccm Millon-Reagenz und vergleicht mit der Tyrosin-Lösung, die man mit 5%iger Schwefelsäure soweit verdünnt, daß sie in 10 ccm 1 mg Tyrosin enthält. Die am Dubosq-Kolorimeter abgelesenen Werte lauten:

Standardlösung:

0,3%ige Eiweißlösung	20 : 13,7; 14; 14.
Albumin	20 : 12,7; 12,7.
Globulin	20 : 14; 14,2; 13,9.

Berechnung des Tyrosingehaltes im Gesamteiweiß:

$\frac{20 \cdot 1}{14} = 1{,}429$ mg Tyrosin in 10 ccm einer 0,3%igen Lösung. Der Prozentgehalt berechnet sich daraus für Gesamteiweiß auf 4,76%, für Albumin 5,25%; für Globulin 4,76%.

3. Cystin.

1 g trockenes Eiweiß wird 6 Stunden hydrolysiert, mit Kohle entfärbt, verdünnt, mit Natronlauge auf pH 2—3 gebracht (Kongopapier fängt eben an, die blaue Farbe zu verlieren) und dann mit 0,1-n/HCl auf 200 ccm aufgefüllt.

Mit 5 ccm dieser Lösung wird die Farbenreaktion nach Sullivan angestellt und im Dubosq mit einer Cystin-Lösung verglichen, die durch Verdünnung mit n/10 HCl aus der Standardlösung hergestellt wurde, sodaß sie in 5 ccm 1,5 mg Cystin enthält. Abgelesene Werte:

Cystin-Standard-Lösung:

0,5%ige Eiweißlösung	= 10 : 10,3; 10,5; 10,2.
Albumin	10 : 10; 9,7; 9,8.
Globulin	10 : 11,7; 11,6; 11,5.

Berechnung des Cystingehaltes in 5 ccm der 0,5%igen Lösung:

$\frac{10 : 1{,}5}{10{,}3}$ = 1,456 mg Cystin = 5,02% im Gesamteiweiß.

Albumin: 1,5 mg Cystin = 6,12%.

Globulin: 1,293 mg Cystin = 5,17%.

4. Arginin.

1 g trockenes Eiweiß wird hydrolysiert, das Hydrolysat mit Kohle entfärbt, gut nachgewaschen, mit Natronlauge neutralisiert und auf 100 ccm aufgefüllt. Die Fällung der Hexonbase wird nach der oben beschriebenen Methode von Van Slike ausgeführt. Nach der Neutralisation wird auf 4 Liter aufgefüllt und 5 ccm dieser Lösung für die Farbenreaktion verwendet:

Abgelesene Werte am Stufenphotometer:

Gesamteiweiß:	32,5; 32,2; 33.
Albumin:	30; 30,5; 30,5; 31.
Globulin:	15,5; 16; 16,5.

Entsprechende Argininwerte aus der Eichkurve:

Gesamteiweiß:	0,0111 mg Arginin = 4,44%
Albumin:	0,0119 mg Arginin = 4,76%
Globulin:	0,0197 mg Arginin = 7,88%.

Die bei einigen anderen Seren an verschiedenen Verdünnungsreihen der Hexonbasenlösung angestellten Untersuchungen haben folgendes gezeigt:

Verdünnungsgrade	abgelesene Werte	Prozentgehalt
1 : 400	57; 55; 55.	
1 : 1000	37,5; 37;	1,1%
1 : 2000	17,5; 17,3; 17,4.	4,5%
1 : 4000	33,5; 33; 34; 34.	5%
1 : 8000	55,5; 56; 55,7.	3,7%
1 : 16 000	75,5; 73,5; 73.	1%

Durch diese Untersuchungen, die mehrfach ausgeführt wurden, hat sich gezeigt — wie ich schon oben darauf hingewiesen habe — daß die Farbenintensität nicht proportional der Verdünnung ist, sondern zuerst zu- und dann wieder abnimmt. Die größte Farbenintensität ist in allen untersuchten Seren bei einer Verdünnung von 1 : 4000 festgestellt worden. Weiterhin ist auffallend, daß der Argininingehalt — wie bei allen Aminosäuren überhaupt — im Gesamteiweiß kleiner ist als in den einzelnen Fraktionen, wie auch schon andere Untersucher, selbst durch andere Methoden, festgestellt haben und für die man noch keine rechte Erklärung gefunden hat.

5. Histidin.

Das Histidin wird in der Hexonbasenlösung, in der auch das Arginin bestimmt wird, untersucht. Man nimmt aber eine Verdünnung von nur 1 : 2000. Für die Farbenreaktion genügt 1 ccm der Lösung.

Abgelesene Werte am Stufenphotometer:		mg Histidin pro ccm aus der Eichkurve:	%-Gehalt
Gesamteiweiß:	58; 59; 60,5	0,00875	1,75
Albumin:	55; 57; 57	0,00925	1,85
Globulin:	42,5; 43; 43,2.	0,014	2,8.

An diesem Beispiel wurde der Gang der Untersuchung für die Bestimmung der Aminosäuren in einem Serum gezeigt. Nach derselben Methode wurden auch die anderen Seren untersucht.

Die einzelnen Ergebnisse werden in besonderen Tabellen zusammengestellt. In diesen Tabellen ist neben dem Prozentgehalt auch die Zahl des molekularen Verhältnisses der einzelnen Aminosäuren angegeben. Sie berechnet sich aus dem Prozentgehalt, indem man diese Zahlen durch das Molekulargewicht der betreffenden Aminosäuren dividiert, welches für Tryptophan = 204,12 ist; Cystin = 240,26; Histidin = 155,10; Arginin = 174,15 ist. Z. B.: Tryptophangehalt im Serum 1 = 1,76%. Molekulares Verhältnis = 1,76: 204,12 = 0,00862. Man bringt die Verhältnisse auf eine ganze Zahl durch Multiplikation mit 5 und erhält so die Zahl 4. Auf dieselbe Weise berechnet sich das molekulare Verhältnis bei einem Tyrosingehalt von 4,76% auf die Zahl 13, d. h. das molekulare Verhältnis von Tryptophan zu Tyrosin = 4 : 13.

Die Ergebnisse aus den Untersuchungen der verschiedenen Seren waren folgende:

Serum 1 (Musterbeispiel).

	Tryptoph.: %	Tyrosin: %	Cystin: %	Histidin: %	Arginin: %
Gesamteiweiß:	1,76	4,76	5,02	1,75	4,44
Molekularverhältn.:	4	13	10	5	11,5
Albumin:	1,24	5,25	6,12	1,85	4,76
Molekularv.:	3	14	12,5	5	13
Globulin:	3,32	4,76	5,17	2,8	7,88
Molekularv.:	8	13	10	9	22,5

Aus dieser Tabelle ist zu ersehen, daß die Aminosäuren im Albumin und Globulin in verschiedenem Molekularverhältnis vorkommen. Der Tryptophangehalt im Globulin ist sehr viel größer als im Albumin, was eine bekannte Tatsache ist. Erwähnt sei noch, daß im Serum kein freies Tryptophan gefunden wurde, wie auch schon von anderer Seite festgestellt worden ist. Während das Tyro-

sin im Albumin und Globulin ziemlich konstant vorkommt, nimmt der Cystingehalt in den Globulinen wieder ab. Arginin und Histidin kommt dagegen im Globulin wieder in größerer Menge vor. Dieses konstante Molekularverhältnis der Aminosäuren im Albumin und Globulin ist in allen Seren ohne erhöhte Senkungsgeschwindigkeit anzutreffen.

Serum 2.

Serum mit geringer Erhöhung der Senkungsgeschwindigkeit (Mittelwert 12) eines Patienten mit Hypertonie und Diabetes mellitus.

Gesamteiweiß: 7,83% Albumin: 4,43% Globulin: 2,35%

Verhältnis Albumin: Globulin 1,88 : 1.

	Tryptoph.: %	Tyrosin: %	Cystin: %	Histidin: %	Arginin: %
Gesamteiweiß:	1,65	4,44	6,0	1,45	4,12
Molekularverh.:	4	12	12	5	12
Albumin:	1,4	4,8	6,12	1,67	4,52
Molekularv.:	3	13	13	5	13
Globulin:	3,3	4,5	5,13	2,95	6,44
Molekularv.:	8	12	10	9,5	18

Serum 3.

Serum mit erhöhter Senkungsgeschwindigkeit (Mittelwert 34) eines Patienten mit chronischer Nephritis und Uraemie.

Gesamteiweiß: 5,8% Albumin: 2,5% Globulin: 2,7%

Verhältnis Albumin: Globulin 0,93 : 1.

	Tryptoph.: %	Tyrosin: %	Cystin: %	Histidin: %	Arginin: %
Gesamteiweiß:	1,7	5,3	4,5	1,9	4,6
Molekularverh.:	4	14,5	9	6	13
Albumin:	1,1	5,4	4,6	2,4	5,0
Molekularverh.:	2,5	15	9,5	7,4	14
Globulin:	2,7	5,1	4,4	1,8	5,6
Molekularverh.:	6,5	14	9	5,5	16

In diesem Serum ist auffallend der verminderte Gehalt an Histidin im Globulin, was auch im Serum 5 der Fall ist.

Serum 4.

Serum mit erhöhter Senkungsgeschwindigkeit (Mittelwert 40) eines Patienten mit Arthritis rheumatica.

Gesamteiweiß: 7,83% Albumin: 3,66% Globulin: 3,25%
Verhältnis Albumin: Globulin 1,13 : 1.

	Tryptoph.: %	Tyrosin: %	Cystin: %	Histidin: %	Arginin %
Gesamteiweiß:	1,82	4,44	5,66	3,35	6,32
Molekularverh.:	4,5	12	11	10,5	18
Albumin:	1,10	4,76	5,88	4,0	9,2
Molekularverh.:	2,5	13	12	13	26
Globulin:	3,04	4,5	5,08	3,0	8,2
Molekularverh.:	7,5	12	10	9,5	23

Serum 5.

Serum mit erhöhter Senkungsgeschwindigkeit (Mittelwert 54) eines Patienten mit Carcinoma ventriculi.

Gesamteiweiß: 7,7%; Albumin: 3,8%; Globulin: 3,4%;
Verhältnis von Albumin: Globulin 1,12 : 1.

	Trypoph.: %	Tyrosin: %	Cystin: %	Histidin: %	Arginin: %
Gesamteiweiß:	2,06	5,3	4,7	2,0	5,0
Molekularverh.:	5	14,5	10	6	14
Albumin:	1,2	5,4	4,8	3,2	4,3
Molekularverh.:	3	15	10	7	12
Globulin:	3,2	5,1	4,4	1,5	6
Molekularverh.:	7,5	14	9	5	17

Serum 6.

Serum mit erhöhter Senkungsgeschwindigkeit (Mittelwert: 19) eines Patienten mit Cerebralsklerose.

In diesem Serum wurde nur das Gesamteiweiß untersucht, welches 7,9% betrug.

	Tryptoph.: %	Cystin: %	Tyrosin: %	Histinin: %	Arginin: %
Gesamteiweiß:	1,8	5,26	4,16	2,1	5,8
Molekularverh.:	4	15	8,5	6,5	16

Serum 7.

Serum mit erhöhter Senkungsgeschwindigkeit (Mittelwert: 40) eines Patienten mit Arteriosklerose. Gesamteiweiß: 8,1 %.

	Tryptoph.: %	Tyrosin: %	Cystin: %	Histidin: %	Arginin: %
Gesamteiweiß:	2,55	7,6?	4,0	2,9	3,6
Molekularverh.:	6	?	8	6,5	10

Nachdem ich in diesen Tabellen die Ergebnisse aus den Untersuchungen der einzelnen Seren aufgeführt habe, möchte ich zum besseren Vergleich der einzelnen Zahlenwerte der Molekularverhältnisse der Aminosäuren in den Seren ohne erhöhte Senkungsgeschwindigkeit mit denen mit erhöhter Senkungsgeschwindigkeit die Werte aus sämtlichen Seren in Tabellen zusammenfassen.

Tabelle 1.

	Serum 1 Hypertonie:	2 Hypertonie:	3 chron. Nephritis	4 Arthritis rheum.:	5 Carcin. ventriculi	6 Cerebralskler.:	7 Arterioskler:
Blutsenkungsgeschwindigkeit:	normal.	12	34	40	54	19	40
Gesamteiweiß %:	8,9	7,83	5,8	7,83	7,7	7,9	8,1
Albumin %:	4,7	4,43	2,5	3,66	3,8	—	—
Globulin %:	2,69	2,35	2,7	3,25	3,4	—	—
Verhältnis Albumin: Globulin:	1,75 : 1	1,88 : 1	0,93 : 1	1,13 : 1	1,12 : 1	—	—
Ges. E.:	4	4	4	4,5	5	4	6
Tryptophan: Alb.:	3	3	2,5	2,5	3	—	—
Glob.:	8	8	6,5	7,5	7,5	—	—
Ges. E.:	13	12	14,5	12	14,5	15	—
Tyrosin: Alb.:	14	13	15	13	15	—	—
Glob.:	13	12	14	12	14	—	—
Ges. E.:	10	12	9	11	10	8,5	—
Cystin: Alb.:	12,5	13	9,5	12	10	—	—
Glob.:	10	10	9	10	9	—	—
Ges. E.:	5	5	6	10,5	6	6,5	6,5
Histidin: Alb.:	5	5	7,5	13	7	—	—
Glob.:	9	9,5	5,5	9,5	5	—	—
Ges. E.:	12,5	12	13	18	14	16	10
Arginin: Alb.:	13	13	14	26	12	—	—
Glob.:	22,5	18	16	23	17	—	—

Tabelle 1 zeigt uns das molekulare Verhältnis der Aminosäuren im Gesamteiweiß, Albumin und Globulin der verschiedenen Seren nebeneinander. Gleichzeitig sind die Gewichtsprozente der Eiweißfällungen und das Verhältnis von Albumin: Globulin angegeben. Durch Vergleich der Zahlen läßt sich ersehen, daß sich das Verhältnis der Monoaminosäuren im Serum mit erhöhter Senkungsgeschwindigkeit nicht wesentlich ändert, beim Cystin sogar ziemlich konstant bleibt; auch die Tryptophanwerte sind nicht besonders stark erhöht. Dagegen zeigt das Histidin und Arginin eine starke Erhöhung, vor allem im Serum 4 bei Arthritis rheumatica. Im Globulin dagegen ist es relativ vermindert.

In den Tabellen 2, 3 und 4 sind die Zahlenwerte so zusammengestellt, daß man einen besseren Vergleich der Molekularverhältnisse in den einzelnen Fraktionen des Serums hat.

Tabelle 2.

Molekulares Verhältnis der Aminosäuren im Gesamtserumeiweiß der untersuchten Seren.

		Tryptoph.: %	Tyrosin: %	Cystin: %	Histidin: %	Arginin: %
	Serum:					
normale Senkung	1:	4	13	10	5	12,5
	2:	4	12	12	5	12
erhöhte Senkung	3:	4	14,5	9	6	13
	4:	4,5	12	11	10,5	18
	5:	5	14,5	10	6	14
	6:	4	15	8,5	6,5	16
	7:	6	?	8	6,5	10

Tabelle 3.

Molekulares Verhältnis der Aminosäuren in den Albuminfraktionen der untersuchten Seren.

		Tryptoph.: %	Tyrosin: %	Cystin: %	Histidin: %	Arginin: %
	Serum:					
normale Senkung	1:	3	14	12,5	5	13
	2:	3	13	13	5	13
erhöhte Senkung	3:	2,5	15	9,5	7,5	14
	4:	2,5	13	12	13	26
	5:	7,5	14	9	5	17

Tabelle 4.

Molekulares Verhältnis der Aminosäuren in den Globulinfraktionen der untersuchten Seren.

		Tryptoph.: %	Tyrosin: %	Cystin: %	Histidin: %	Arginin: %
	Serum:					
normale Senkung	1:	8	13	10	9	22,5
	2:	8	12	10	9,5	18
erhöhte Senkung	3:	6,5	14	9	5,5	16
	4:	7,5	12	10	9,5	23
	5:	7,5	14	9	5	17

Zusammenfassung.

1. Die Untersuchungen über den Einfluß von Krankheiten auf die Serumeiweißkörper haben gezeigt, daß das molekulare Verhältnis der Mono-Aminosäuren im Gesamteiweiß und in den Eiweißfraktionen Albumin und Globulin auch bei krankhaften Zuständen, die sich durch die erhöhte Senkungsgeschwindigkeit nach außen dokumentieren, ziemlich konstant bleibt.

2. Die Hexonbasen Histidin und Arginin sind in einzelnen Seren mit erhöhter Senkungsgeschwindigkeit im Gesamteiweiß und in der Albuminfraktion sehr stark vermehrt, in der Globulinfraktion relativ vermindert.

3. Am konstantesten ist das molekulare Verhältnis von Cystin in den untersuchten Seren.

Literatur-Verzeichnis.

1. Svedberg: Ultrazentrifugale Dispersitätsbestimmungen an Eiweißlösungen. Kolloid-Zeitschrift, Band 51, Heft 1 (1930), S. 10.
2. Sörensen, S. P. L.: Die Konstitution der löslichen Proteinstoffe als reversibel dissoziable Komponentensysteme. Kolloid-Zeitschrift, Band 53, 102—124, 170—199; 306—318.
3. Anton Fischer und Alfred Blankenstein: Untersuchungen über die chemische Konstitution der Serumeiweißkörper. Biochemische Zeitschrift, Band 220 (1930), 4./6. Heft, S. 380.
4. Richard J. Block: 1. The basic amino acids of serum proteins. III. A chemical relationship between serum proteins of various origins. The Journal of biological chemistry, Band 104, Nr. 2, Februar 1934.
   2. The determination of the basic amino acids in small quantities of proteins by the silver precipitation method.
5. Arcand, A.: Dosage des protides du sérum sanguin par la methode à l'acétone de Piettre et Vila. J. Pharmacie, VIII, S. 13, 518—528 (1931).
6. Howe, Paul E.: The determination of proteins in blood. A micromethod. Journ. of. biol. chemistr., Band 49, Nr. 1, S. 109—133, (1921).
7. Winkler: Über die Tryptophan-Reaktion von Adamkiewicz-Hopkins. Hoppe-Seyler's Zeitschrift, Band 228, 50 (1934).
8. Otto Fürth und Anton Fischer: Über die Ermittlung des Tyrosingehaltes von Proteinen III. Biochemische Zeitschrift, Band 154, Heft 1/2, (1924), S. 2.
9. Sullivan, M. X.: Studies of the biochemistry of sulphur. Publ. Health, Rep. 1929 I, 1421—1428.
10. Abderhalden: Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden, Abt. I, Teil 7, S. 53.
11. Erik Jorpes und S. Thoren: The use of the Sakaguchi-reaktion for the quantitative determination of arginine. Biochem. 1932, Band 26.
12. Erik Jorpes: The colorimetric determination of histidine.

Lebenslauf.

Am 6. März 1907 wurde ich zu Baumersreuth in Oberfranken als Sohn des Prokuristen Andreas Schörner und seiner Ehefrau, geb. Popp, geboren. Nach dem Besuch der Volksschule in Schwarzenbach(Saale) trat ich im September 1918 in die Oberrealschule in Hof ein und machte dort im April 1927 mein Abiturienten-Examen. Im Sommer 1927 zog ich dann auf die Universität nach Heidelberg und wandte mich dem Studium der Medizin zu. Nach 3 Semestern ging ich nach Würzburg und machte dort im Sommer 1929 das medizinische Vorexamen. Meine klinischen Studien betrieb ich an den Universitäten Berlin, Rostock und München, wo ich am 18. Januar 1934 die medizinische Staatsprüfung bestand. Das praktische Jahr leistete ich an der chirurgischen und medizinischen Poliklinik in München und zuletzt am Institut für vegetative Physiologie der Universität Frankfurt a. M. ab. Am 31. Januar 1935 erhielt ich meine Approbation als Arzt. Am 1. April 1935 wurde mir eine ordentliche Assistentenstelle am Institut für vegetative Physiologie der Universität in Frankfurt a. M. übertragen.

gez. Erwin Schörner.